

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON
HALOFENAT AUF DIE HARNSÄURE
IM SERUM UND IM URIN DES MENSCHEN

Berndt Grafe

1977

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. N. Zöllner

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON HALOFENAT AUF DIE
HARNSÄURE IM SERUM UND IM URIN DES MENSCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Berndt Grafe

aus

. München

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr. G. Wolfram

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.7.77



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	5
Hypertriglyzeridämie - Hyperurikämie	
Halofenat: ein Clofibratderivat	
Pharmakologie von Halofenat	
B. PROBLEMSTELLUNG	8
C. METHODIK	9
1. Versuchspersonen und Versuchsablauf	9
2. Untersuchungsmethoden	10
a) Enzymatische Bestimmung von Harnsäure im Serum und Urin	10
b) Bestimmung von Oxypurinen (Xanthin, Hypoxanthin) im Urin	13
c) Messung der Harnsäurebindung an Serum- proteine	16
d) Eiweißbestimmung	19
e) Lipoidextrakt	21
f) Bestimmung der Neutralfette im Serum	22
D. ERGEBNISSE	25
1. Wirkungseintritt und Wirkungsdauer	25
2. Einmalige Gabe von 1,0 g	25
3. Einmalige Gabe von 1,5 g	29
4. Einmalige Gabe von 2,0 g	29
5. Einnahme von 1,5 g täglich über 3 Tage	30
6. Dosis-Wirkungsbeziehung	32
7. Veränderte Bindung von Harnsäure an Serumproteine nach Einnahme von 3,0 g	33
E. DISKUSSION	41
F. ZUSAMMENFASSUNG	49
G. LITERATURVERZEICHNIS	51

A. Einleitung:

Erhöhte Triglyzerid- und Harnsäurekonzentrationen im Blut bedeuten ein doppeltes Risiko für die Entwicklung einer schweren Allgemeinerkrankung, bei der insbesondere das Gefäßsystem geschädigt wird. Von Seiten der Hypertriglyzeridämie ist unter anderem die Entstehung einer Arteriosklerose zu befürchten. Die Hyperurikämie fördert wahrscheinlich am Gefäßendothel die Ablagerung von Mikrothromben durch gesteigerte Bildung von Thrombozytenaggregationen (Newland 1968). Eine länger dauernde Harnsäureerhöhung im Blut kann nicht nur zur Manifestation einer Gelenk-Gicht, sondern auch zu einer Nephropathie, bei der sich Harnsäurekristalle vor allem im Nierenmark ablagern, einer Hypertension und einer hypertoniebedingten Arteriosklerose führen. Gichtpatienten weisen neben der Hyperurikämie oft noch als zweiten Risikofaktor eine Hypertriglyzeridämie auf (Berkowitz 1964, Feldman und Wallace 1964, Benedek 1967, Barlow 1968, Emmerson et al. 1971). Die prozentuale Häufigkeit dieser Kombination wird unterschiedlich beurteilt, dürfte aber ungefähr 50 % der Patienten mit Hypertriglyzeridämie betreffen. Emmerson et al. (1971) und Feldman und Wallace (1964) konnten dabei keine Beziehung zwischen dem Grad der Hypertriglyzeridämie und dem Grad der Harnsäuremehrprouktion finden. Hohe Serumtriglyzeridwerte bei der

Gicht stehen vermutlich mit Fettleibigkeit und Alkoholabusus in Verbindung, da sich eine Beziehung zwischen Übergewicht und Triglyzeridspiegel aufzeigen läßt (Gibson und Grahame 1974). Dieselben Autoren konnten außerdem bei vergleichenden Untersuchungen von 50 Patienten mit Gicht und 50 entsprechend Übergewichtigen Personen ohne Gicht keinen signifikanten Unterschied der Triglyzeridkonzentrationen im Serum feststellen.

Bei der Behandlung von Hyperlipoproteinämien der Typen III, IV und V nach Fredrickson wird zur Reduzierung erhöhter Triglyzerid- und Cholesterinspiegel unter anderem das Clofibrat eingesetzt. Mit der Senkung der Serumlipidspiegel ließen sich jedoch nicht immer die signifikanten Therapieerfolge in der Prophylaxe der Koronarerkrankungen und in der Abnahme der Todesfälle, besonders bei Patienten mit Angina pectoris, in Zusammenhang bringen (Krasno und Kidera 1972, Dewar und Oliver 1971). Deshalb werden von diesen Autoren andere Wirkungsmechanismen, wie die Abnahme der Plättchenadhäsion, der erhöhten Spiegel von unveresterten Fettsäuren und der erhöhten Fibrinogenspiegel, sowie eine gesteigerte fibrinolytische Aktivität unter Clofibratbehandlung als Ursache der verbesserten Koronarprognose diskutiert. Außerdem fanden Berkowitz (1965) sowie Trevaks und Lovell (1965), im Gegensatz zu anderen Autoren, einen uricosurischen Effekt nach Clofibratgabe. In einer späteren Langzeitstudie wurde eine Senkung der pathologischen

Serumharnsäurewerte bei 65 % der 50 Patienten nach Behandlung der Hyperlipidämie beobachtet (Berkowitz 1971). Seit einiger Zeit wird ein neues, hypolipidämisch wirkendes Medikament, Halofenat, [2-acetoamidoethyl (4-chlorophenyl) (3-trifluoromethylphenoxy) acetat] untersucht, das chemisch ein Clofibratderivat darstellt. Dabei ließ sich eine signifikante Senkung der Serumtriglyzeridspiegel nachweisen (Jain et al. 1970, Morgan et al. 1971, Berkowitz 1971, Aronow et al. 1973). Zusätzlich fanden Jain und Mitarbeiter 1970 einen Abfall des Serumharnsäurespiegels, der von anderen Forschern bestätigt wurde (Morgan et al. 1971, Aronow et al. 1973, Ravenscroft et al. 1973, Schlosstein et al. 1973). Für die Therapie von Stoffwechselerkrankungen, bei denen Hypertriglyzeridämie und Hyperurikämie gleichzeitig bestehen und die bisher nicht mit einer Monosubstanz behandelt werden konnten, stellen diese Wirkungen von Halofenat einen Fortschritt dar.

Der neue Wirkstoff Halofenat⁺ wurde von Hucker et al. (1971) an Ratten, Hunden, Rhesusaffen und Menschen untersucht. Beim Menschen erfolgte nach oraler Gabe während der Absorption im Magendarmtrakt eine schnelle Hydrolyse des Azetats zur freien Säure, der (4-chlorophenyl) (3-trifluoromethylphenoxy) Essigsäure (HFA). Die einmalige Einnahme von 3 mg/kg Halofenat ergab ein Konzentrationsmaximum von 14 µg/ml HFA im Plasma. Fast 100 % waren bei HFA-Plasmakonzentrationen von 50 - 200 µg/ml an Plasmaproteine gebunden. Die Gesamtausscheidung von radioaktiv markierter

⁺ MK - 185 der Firma Merck Sharp und Dohme

HFA betrug 46 % im Urin und 26 % im Stuhl innerhalb von 6 Tagen. Halofenat wurde nicht oxidativ im menschlichen Körper verändert, sondern im Urin zu 70 % als freie Säure (HFA) und der Rest als HFA-Glucuronide ausgeschieden. Es zeigt sich, daß Halofenat verschieden lange Halbwertszeiten besitzt: eine Halbwertszeit von 24 Std. im Plasma, die dann (nach 24 Std.) in eine langsamere Phase von 48 Std. übergeht.

B. Problemstellung:

In der vorliegenden Arbeit soll bei Gesunden die mögliche uricosurische Wirkung von Halofenat nach unterschiedlicher Dosierung untersucht werden. Es erschien uns wichtig, folgende Fragen zu klären:

1. Wie verändern sich Serumharnsäure und Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurinen im 24 Std.-Urin nach Halofenateinnahme und wie verhalten sich die Serumtriglyzeride dabei?
2. Kann Halofenat die Harnsäurebindung an Serumproteine beeinflussen und dadurch uricosurisch wirken?

C. Methodik:

1. Versuchspersonen und Beschreibung der Versuche:

Die Wirkung von Halofenat wurde an 4 Probanden (Körpergewicht zwischen 60 und 78 kg), die klinisch gesund waren, folgendermaßen untersucht:

Harnsäure und Triglyzeride wurden im Blut der Versuchspersonen nüchtern vor und in bestimmten Zeitabständen nach oraler Einnahme der Substanz gemessen, ebenso Harnsäureausscheidung und Oxypurine im 24 Std.-Urin. Ess- und Trinkgewohnheiten sollten beibehalten, jedoch auf ein plötzliches erhöhtes Purinangebot aus der Nahrung (besonders Innereien), sowie auf andere Medikamente verzichtet werden.

- a) Für die Bestimmung des Wirkungseintritts nach einmaliger Einnahme von Halofenat erfolgte über 8 Stunden eine stündliche Blutabnahme an der weiterhin nüchternen Versuchsperson. Es wurden die Serumharnsäure und die Serumtriglyzeride nach einer Dosierung von 0,5, 1,0 und 2,0 g Halofenat gemessen.
- b) Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung nahmen wir bis zu 2 Tagen vor und bis zu 7 Tagen nach einer einmaligen Gabe von jeweils 1,0, 1,5 und 2,0 g Halofenat an der nüchternen Person alle 24 Std. Blut ab. Zusätzlich wurde 10 Std. nach Einnahme (5 Std. nach dem Mittagessen) ein einmaliger Zwischenwert bestimmt. Die Serumharnsäure und die Serumtriglyzeride (mit Ausnahme des 10 Std.-Wertes) wurden hierbei kontrolliert. Außerdem wurde die Harnsäureausscheidung im 24 Std. Urin gemessen.
- c) Vier Versuchspersonen erhielten nach Vorkontrollen von 2 Tagen an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine Einzeldosis von 1,5 g Halofenat. Serumharnsäure, Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurinen im 24 Std. Urin, sowie Serumtriglyzeride wurden nach Einnahme der Gesamtdosis bis zum 7. Tag täglich und dann wieder am 10. und 14. Tag untersucht.

- d) Zur Bestimmung der Harnsäurebindung an Serumproteine wurden an zwei Tagen jeweils 1,5 g Halofenat nüchtern eingenommen. Die Blutabnahme erfolgte morgens nüchtern am ersten Tag und nach 34 Std. abends am zweiten Tag (6 Std. nach der letzten Nahrungsaufnahme).

Untersuchungsmaterial:

Das Nativblut wurde 10 min. zentrifugiert (3000 U/min.) und das Serum abpipettiert. Der Urin wurde über 10 ml Toluol gesammelt, um eine Oxydation der Harnsäure zu vermeiden. Eine adäquate Probeentnahme erfolgte erst nach ausgiebigem Mischen zur Auflösung eines eventuellen Niederschlags. Die verschlossenen Serum- und Urinproben ließen sich für unsere Bestimmungen tiefgefroren aufbewahren.

2. Untersuchungsmethoden:

a) Enzymatische Harnsäurebestimmung im Serum und Urin:

Prinzip:

Uricase, ein im menschlichen Stoffwechsel während der Evolution durch Mutation verlorengegangenes Enzym, kann Harnsäure weiter zu Allantoin abbauen. Proportional zum Abbau verschwindet das für Harnsäure typische Absorptionsmaximum bei 293 nm. Die darauf beruhende Methode von Praetorius und Poulsen (1953) wurde in der Modifikation von N. Zöllner (1963) verwendet. Dabei beträgt für eine Harnsäurekonzentration von 1 µg/ml unter Verwendung des unten beschriebenen Glycinpuffers und einer Schichtdicke von 1 cm der Extinktionsabfall 0,0745.

Reagenzien:

Muldestor: metallionenfreies destilliertes Wasser

Glycinpufferstammlösung: 0,66 m, pH = 9,3

25,0 g kristallines Glycin werden in 200 ml destilliertem Wasser aufgelöst; nach Zugabe von 110 ml n NaOH wird auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Das pH wird mit einem pH-Meter kontrolliert und eventuell unter tropfenweise Zugabe von 5 n - HCl bzw. NaOH eingestellt. Die über Chloroform aufbewahrte Lösung ist im Kühlschrank haltbar.

Glycinpuffergebrauchslösung: Die Stammlösung wird im Verhältnis 1 : 10 mit Muldestor verdünnt.

Uricasestammlösung: Uricase (75 Einheiten) wurde von der Firma LØVEN, Kemiske Fabrik Kopenhagen, bestellt und kühl gelagert. Das Trockenpräparat wird in 0,25 ml Puffergebrauchslösung aufgelöst. Nach 15 min kann mit Puffergebrauchslösung auf 1 : 200 (Auffüllen eines 50 ml Kölbchens) verdünnt werden, wodurch man die Uricasegebrauchslösung erhält.

Lithiumcarbonat: 0,5 % (0,5 g Lithiumcarbonat in 100 ml Muldestor gelöst)

Durchführung:

Serumverdünnung: 0,4 ml Serum ad 10 ml (10 ml Kölbchen) mit Puffergebrauchslösung auffüllen.

Urinverdünnung: 1 ml Urin wird mit 0,5 ml Lithiumcarbonat (0,5 %) und 8,5 ml Muldestor auf 10 ml verdünnt und gut gemischt. Davon werden dann 0,4 ml wie bei der Serumverdünnung in 10 ml Kölbchen pipettiert und mit Puffergebrauchslösung ad 10 ml aufgefüllt.

Folgende Ansätze werden für die photometrische Messung gemacht:

- I. Bestimmung der Eigenextinktion (E_F) der Uricase:
 - (1.) 2 ml Puffergebrauchslösung + 1 ml Uricasegebrauchslösung
 - (2.) 3 ml Puffergebrauchslösung

II. Bestimmung des Extinktionsabfalls (E_{HS}) :

(3.) 2 ml verdünntes Serum (Urin) + 1 ml

Puffergebrauchslösung

(4.) 2 ml verdünntes Serum (Urin) + 1 ml

Uricasegebrauchslösung

Zur Kontrolle werden bei allen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Zugabe der Uricasegebrauchslösung sollte zuletzt erfolgen. Nach gutem Mischen dauert es ca. 30 min bis die Fermentreaktion vollständig abgelaufen ist. Die photometrische Messung wird bei Wellenlänge 293 nm mit Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke ausgeführt. Zur Bestimmung von E_F dient Ansatz I_1 als Nullwert gegen Ansatz I_2 , zur Bestimmung von E_{HS} dient Ansatz II_4 als Nullwert gegen Ansatz II_3 .

Berechnung:

Nach dem Lambert - Beer'schen Gesetz stellt die gemessene Extinktionsdifferenz E_{HS} ein Maß für die Höhe der vorhandenen Harnsäurekonzentration dar. Da durch die Eigenextinktion E_F des Uricasezusatzes die wahre Extinktionsdifferenz ΔE verkleinert wird, gilt

$$\Delta E = E_{HS} + E_F$$

Berücksichtigt man, daß der Extinktionskoeffizient 0,0745 beträgt, ergibt sich für die Harnsäurekonzentration im Ansatz:

$$\frac{E_{HS} + E_F}{0,0745} = \mu g / ml$$

Bei Berechnung der ursprünglichen Harnsäurekonzentration im Serum (Verdünnung 1 : 25) und Abrundung des Extinktionskoeffizienten erhält man folgende Formel:

$$\frac{(E_{HS} + E_F) \times 3 \times 25 \times 100}{0,075 \times 2 \times 1000} = \frac{(E_{HS} + E_F) \times 100}{2} \text{ mg\%}$$

Für die Konzentration im 24-Std. Sammelurin muß die entsprechende Verdünnung (1 : 250) berücksichtigt werden (Division mit Faktor 10).

Rechenbeispiel:

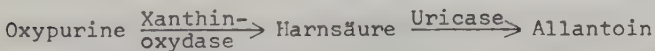
Die Harnsäurekonzentration im Serum beträgt bei einer Uricaseeigenextinktion von $E_F = 0,007$ und einem Extinktionsabfall von $E_{HS} = 0,091$:

$$\frac{(0,091 + 0,007) \times 100}{2} = 4,9 \text{ mg\%}$$

b) Enzymatische Bestimmung von Oxypurinen und Harnsäure im Urin:

Prinzip:

Das Enzym Xanthinoxydase kann im Urin vorhandenes Xanthin und Hypoxanthin (= Oxypurine) in Harnsäure umwandeln. Dadurch entsteht im Urin eine Gesamtharnsäurekonzentration, die höher ist als die vorgegebene, wahre Harnsäurekonzentration. Aus dem Unterschied läßt sich die Konzentration der Oxypurine berechnen.



Die photometrische Messung mit Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke beruht darauf, daß bei 292 nm Oxypurine eine sehr geringe Absorption zeigen, Harnsäure dagegen maximal absorbiert wird. Die im Folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von Klinenberg et al. (1967) an.

Reagenzien:

Hypoxanthin (Kristallin) p.a., Merck

Milk - Xanthin Oxydase, Boehringer Mannheim
 2/3 m Glycinpuffer pH 9,3
 Uricase, 75 Einh., Loevens Kopenhagen.

Glycinpuffergebrauchslösung: Der Glycinpuffer wird im Verhältnis 1 : 10 mit metallionenfreiem destilliertem Wasser verdünnt.

Uricasegebrauchslösung: Das Trockenpräparat wird in 1,0 ml Puffergebrauchslösung aufgelöst.
 Milk-Xanthin Oxydase wird unverdünnt eingesetzt.

Durchführung:

Eichkurve: Von einer 5 mg prozentigen Hypoxanthinlösung (beste Löslichkeit bei pH 8,0) wird eine Verdünnungsreihe hergestellt

Urinverdünnung: 0,5 ml Urin ad 25 ml (Kölbchen) mit Aqua bidest. auffüllen. (Verdünnung 1 : 50 bei Messung im Normalbereich)

Ansätze für die photometrische Messung:

	Urinver- dünnung	Puffer	Xanthin- oxydase	Uricase
(1) wahre Harnsäure	1	2		
(2) Gesamtharnsäure	1	2	0,01	
(3) in Allantoin umgewandelte wahre Harnsäure	1	2		0,05
(4) in Allantoin umgewandelte Gesamtharnsäure	1	2	0,01	0,05
(5) Eigenextinktion Uricase		3		0,05
(6) Eigenextinktion Xanthinoxidase		3	0,01	

(Angaben in ml)

Für die Bestimmung der Eichkurve werden nur die Ansätze (2), (4) und eventuell (6) gebraucht.

Alle 6 Ansätze werden gleichzeitig bearbeitet (immer Doppelwerte). Dabei soll zuerst die Urinverdünnung, dann die Puffergebrauchslösung, die Xanthinoxydase und zum Schluß die Uricasegebrauchslösung in der jeweils vorgeschriebenen Menge in die Reagenzgläser pipettiert werden. An einem automatischen Gerät erfolgt jedesmal eine sorgfältige Mischung der Ansätze.

Die Ablesung bei 292 nm (Beckman Photometer) kann mit den Ansätzen (1), (5) und (6) gleich nach Herstellung beginnen. Ansatz (2) muß 15 min nach Zugabe von Xanthinoxydase, Ansatz (3) 40 min nach Uricasezusatz und Ansatz (4) 55 min nach Gabe von Xanthinoxydase und Uricase gegen Aqua bidest. als Leerwert gemessen werden.

Berechnung:

Die Extinktionsdifferenz der Ansätze (2) - (4) = A ergibt die Gesamtharnsäurekonzentration, die durch die umgewandelten Oxypurine bedingt ist. Die wahre Harnsäurekonzentration errechnet sich aus der Extinktionsdifferenz der Ansätze (1) - (3) = B.

- a) Subtrahiert man A von B, so erhält man eine Differenz C, die der Menge der Oxypurine entspricht. Unter Berücksichtigung der Verdünnungen und des Extinktionskoeffizienten gilt für die in 24 Std. ausgeschiedenen Oxypurine:

$$\frac{C \times 3,06 \times 50}{12,5} \left[\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml}} \right] \times \text{Harnvolumen} \left[\frac{\text{ml}}{\text{die}} \right] = \frac{\mu \text{ Mol}}{\text{die}}$$

- b) Für die Bestimmung der Harnsäurekonzentration im Urin muß zur Extinktionsdifferenz B = (1) - (3) die Eigenextinktion der Uricaselösung (5) dazugerechnet werden.

Die Beachtung von Verdünnung und Extinktionskoeffizienten führt zur folgenden Formel für die Harnsäureausscheidung pro die :

$$\frac{(B + E_{\text{Uricase}}) \times 3,06 \times 50}{0,0745 \times 1000} \times \text{Harnvolumen / die} = \text{mg/die}$$

Beispiel:

Für die Ansätze wurden folgende typischen Extinktionen (Mittelwerte) gemessen:

$$(1) E = 0,5395 \quad (2) E = 0,551 \quad (3) E = 0,2035$$

$$(4) E = 0,2105 \quad (5) E = 0,015 \quad (6) E = 0,013$$

$$\text{es gilt: } A = (2) - (4) = 0,3405 \quad B = (1) - (3) = 0,336$$

$$C = A - B = 0,0045$$

$$E_{\text{Uricase}} = 0,015; \text{Harnvolumen / die: } 1100 \text{ ml}$$

Dann beträgt die Oxypurinmenge im Urin pro die:

$$\frac{0,0045 \times 3,06 \times 50}{12,5} \times 1100 = 60,6 \mu \text{ Mol / die}$$

und die Harnsäuremenge pro die:

$$\frac{(0,336 + 0,015) \times 3,06 \times 50}{0,0745 \times 1000} \times 1100 = 792,9 \text{ mg / die.}$$

c) Bestimmung der Harnsäurebindung an Serumproteine mit Hilfe einer Gleichgewichtsdialyse.

Prinzip:

Serum, das in einer semipermeablen Membran eingeschlossen ist, wird gegen ein großes Puffervolumen dialysiert. Die Harnsäurekonzentration im Puffer ist höher als die im Serum, so daß die Harnsäure ins Serum diffundiert. Da das Serumeiweiß in der durch die semipermeable Membran gebildeten Tasche Harnsäure bindet, ergibt sich nach einer Gleichgewichtsdialyse innerhalb der Membran

eine höhere Konzentration der Harnsäure als außerhalb im Puffer. Diese Konzentrationsdifferenz stellt ein Maß für die gebundene Harnsäure dar. Die Bindung ist abhängig vom pH, der Puffermolarität, der Temperatur, der Harnsäurekonzentration im Puffer und der Proteinkonzentration in der Dialysetasche. Diese Methode, nach der unsere Versuche ausgeführt wurden, haben Klingenberg und Kippen 1970 zum ersten Mal beschrieben.

Reagenzien:

Visking - Dialysierschlauch (Durchmesser 7 mm)

Natriumphosphatpuffer

Harnsäure

Natrium-Azide

Durchführung:

Das nach Zentrifugation gewonnene Serum wird im Kühlschrank bis zur Verwendung am selben Tag aufbewahrt. Der immer frisch zubereitete 0,01 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) enthält 15 mg% Natrium-Azide und 15 mg% Harnsäure. Er wird vor dem Versuch gekocht und dann auf 6 °C abgekühlt.

Die Dialyseschläuche weisen einen durchschnittlichen Porendurchmesser von 15 - 20 Å auf und sind nur für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 10 - 20000 durchlässig. Bei der Vorbereitung müssen die Schläuche auf die gewünschte Länge (für 3 ml Serum) gebracht, an einem Ende verknotet und dann eine Stunde in destilliertem Wasser gekocht werden.

Für die Dialyse haben wir einen 1 l Kolben, dessen Boden plan ist, als Puffergefäß benutzt. Der bis zur 1 l Marke mit Natriumphosphatpuffer gefüllte Kolben nimmt die vorbereiteten Dialysetaschen auf, die 3 ml Serum enthalten und auch am anderen Ende fest verknotet sind.

Die Dialyse dauert 16 Stunden bei einer Temperatur von 6°C und unter ständigem Mischen durch einen Magnetrührer. Die pH-Kontrolle des Puffers erfolgt ebenso wie die Probenentnahme für Harnsäure- und Eiweißbestimmungen vor und nach jedem Versuch. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry, die Harnsäurekonzentration nach Praetorius und Poulsen bestimmt.

Berechnung:

Die Harnsäurekonzentrationen im Puffer bzw. im Dialyseschlauch nach Versuchsablauf sind in der Tab. 8 (Spalte III und IV) aufgeführt. Aus der Differenz dieser Konzentrationen kann die prozentuale Harnsäurebindung an Serumproteine im entsprechenden Puffer berechnet werden; dabei wird die Konzentration im Dialyseschlauch gleich 100 % gesetzt (V).

Spalte VI zeigt die prozentuale Abnahme der Harnsäurebindung nach Einnahme von Halofenat im Vergleich zu den vor Einnahme von Halofenat gefundenen Normalwerten. Vor und nach der Dialyse wurden für die Serumeiweißkonzentration im Dialyseschlauch und für die Harnsäurekonzentration im Puffer ausreichend konstante Werte gefunden (II und III), so daß andere Parameter bei der Berechnung nicht berücksichtigt werden müssen.

Beispiel:

Folgende typischen Werte wurden für den Endpunkt einer Gleichgewichtsdialyse ermittelt:

A. Vor Einnahme von Halofenat:

- (1) Harnsäurekonzentration im Puffer: 15,0 mg %
- (2) Harnsäurekonzentration im Serum : 16,6 mg %
(nach Dialyse)

Die Differenz (2)-(1) beträgt 1,6 mg %, entsprechend einer Harnsäurebindung an Serumproteine von normalerweise 9,6 %.

B. Nach Einnahme von Halofenat:

(1) Harnsäurekonzentration im Puffer: 14,8 mg %

(2) Harnsäurekonzentration im Serum : 15,7 mg %

Die Differenz (2)-(1) beträgt 0,9 mg %; entsprechend einer Harnsäurebindung an Serumproteine von 5,7 %.

C. Bei Vergleich der Ergebnisse von A. und B. findet man eine Abnahme der Harnsäurebindung nach Halofenat-einnahme um 40 %.

d. Eiweißbestimmung

Prinzip:

Diese von Lowry et al. 1951 ausgearbeitete photometrische Methode mit Folin-Phenol Reagenz beruht auf zwei nacheinander ablaufenden Reaktionen:

1. Biuret Reaktion, bei der das Protein mit Kupferionen in alkalischer Lösung reagiert, 2. Reduktion eines phosphormolybdänsauren und phosphorwolframsauren Reagenz (Folin-Phenol Reagenz) mit Hilfe des Kupfer-Protein Komplexes.

Durch Messung der entstandenen Farbreaktion bei Wellenlänge 750 nm (Proteinkonzentration 5-25 µg pro ml im Ansatz) bzw. bei 498 nm (höhere Konzentration) läßt sich die ursprüngliche Eiweißkonzentration aus einer Eichkurve berechnen.

Reagenzien:

A: 2 % Na_2CO_3 in 0,1 n NaOH

B: 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1 % K - Na - Tartrat

C: 50 ml A + 1 ml B (direkt vor Gebrauch mischen)

D: Folin - Ciocalteus Phenolreagenz

E: Folin - Ciocalteus Phenolreagenz - Wasser (1 : 1)
kristallines Rinderserumalbumin p.a. Merck
0,9 % (physiologische) Kochsalzlösung

Durchführung:

Herstellung einer Standardlösung: 40 mg Rinderserumalbumin werden in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

1. Serumverdünnung: 0,1 ml Serum mit 2 ml physiologischer Kochsalzlösung mischen. Davon 0,020 ml (Vollpipette) mit Kochsalzlösung ad 0,2 ml weiterverdünnen.
2. Standardverdünnung: Für die Eichkurve wird von der 40 mg prozentigen Albuminlösung eine Verdünnungsreihe aufgestellt, die Mengen von 5 - 80 µg Protein in 0,2 ml Kochsalzlösung enthält.

Als Leerwert, der im Folgenden wie die Proben weiterbehandelt wird, dienen 0,2 ml Kochsalzlösung.

Zu den verdünnten Proben (immer Doppelwerte) pipettiert man 2 ml Reagenz C, das kurz vorher zubereitet wird, und läßt die Reaktion 10 Minuten ablaufen. Dann wird 0,2 ml Reagenz E dazugegeben und sofort gemischt. Die entstandene Farbreaktion kann nach 30 Minuten mit Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke) bei 498 nm (siehe oben) gemessen werden.

Berechnung:

Aus der Eichkurve ist die entsprechende Proteinmenge für die Probe zu entnehmen. Aus diesem Wert läßt sich unter Berücksichtigung der Serumverdünnung (1 : 210) und der eingesetzten Menge (0,2 ml) die Protein-Konzentration berechnen: Proteinmenge $\times 0,105 = g \%$.

Beispiel:

Für eine typische Serumprobe wird eine Extinktion von $E = 0,286$ gemessen. Auf der Eichkurve läßt sich daher eine Menge von $67 \mu\text{g}$ ermitteln: Für die Konzentration gilt dann:

$$67 \times 0,105 = 7,0 \text{ g } \%$$

e) Lipoidextrakt nach Sperry:

Prinzip:

Die Serumlipide wurden nach der von Sperry beschriebenen Methode extrahiert. Zuerst wird eine Proteinfällung des Serums mit Methanol, in dem die Fettsubstanzen gelöst bleiben, durchgeführt. Der dann hergestellte Chloroform-Methanol Extrakt enthält noch Verunreinigungen nichtlipoider Art, die durch Zugabe einer Calciumchlorid-Lösung entfernt werden. Dabei liegen die meisten Lipide in der Chloroform-Schicht vor; nichtlipide Verbindungen (Kohlenhydrate, anorg. Salze, Aminosäuren und Peptide) sammeln sich in der Wasser- CaCl_2 -Methanol-Phase an. Für die Neutralfettbestimmung ist wichtig, daß die Mono- und Diglyzeride ebenfalls hydrophile Eigenschaften besitzen und sich zum Teil in der Wasser- CaCl_2 -Methanol-Phase anreichern, während die Triglyzeride in der CHCl_3 -Phase (untere Sicht) enthalten sind.

Reagenzien:

Methanol p.a.

Chloroform p.a.

Calciumchloridlösung: 0,02 % in aqua dest.

Durchführung:

Bei der Extraktion wird 1 ml Serum in einen 25 ml Meßkolben getropft, der 8,3 ml Methanol enthält. Die Pipette sollte sich dabei im Hals des Kolbens etwa am Ansatz der Rundung befinden. Während des Zutropfens wird der Kolben

vorsichtig geschüttelt, damit eine möglichst feine Fällung der Proteine erreicht wird. Ein volumengerechtes Auslaufen der Pipette erreicht man am Schluß durch Tippen der Pipettenspitze gegen die Glaswand. Dann werden etwa 9 ml Chloroform dazugegeben und im Wasserbad unter leichtem Schütteln des Kolbens gerade bis zum Kochen erhitzt. Nach Abkühlung muß der Kolben mit CHCl_3 bis zur 25 ml Marke aufgefüllt und durch 10maliges Umkippen gemischt werden.

Der Extrakt wird schnell (um Verdunstung zu vermeiden) durch ein weiches Faltenfilter filtriert. Vom Filtrat pipettiert man sofort 20 ml in einen 25 ml Schüttelzylinder und gibt 8 ml einer 0,02 %igen CaCl_2 -Lösung dazu. Nach langem, kräftigem Schütteln bleibt der Extrakt zur Phasentrennung über Nacht stehen. Wassertropfen, die an der Wand in der unteren Phase haften, werden durch Beklopfen zum Aufsteigen veranlaßt. Wenn sich dann zwischen den Phasen eine scharfe Grenzschicht im Zylinder abgezeichnet hat, wird das Volumen der Chloroformphase (untere Phase) notiert. Zur weiteren Verwendung (z.B. Neutralfettbestimmung) braucht man nur die untere Phase (Lipoid) und kann deshalb die obere Phase absaugen und verworfen.

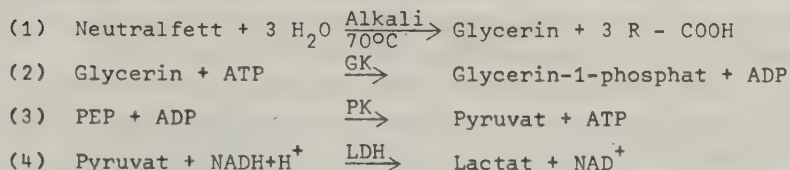
f) Enzymatische Bestimmung von Neutralfetten im Serum:

Prinzip:

Bei der Verseifung von Neutralfetten entstehen Glycerin und freie Fettsäuren (1). Enzymatisch läßt sich dann über den Glyceringehalt die Konzentration der Neutralfette bestimmen.

Glycerin reagiert mit ATP in einer durch Glycerokinase (GK) katalysierten Reaktion zu Glycerin-1-phosphat und ADP (2). Mit Hilfe von Pyruvatkinase werden dann ADP und Phosphoenolpyruvat (PEP) in ATP und Pyruvat übergeführt

(3). Die Indikatorreaktion stellt die Bildung von Lactat und NAD^+ aus Pyruvat und NADH in Anwesenheit von Lactatdehydrogenase dar (4).



Bei 366 nm Wellenlänge wird die Abnahme von NADH, die der verbrauchten Glycerinmenge proportional ist, photometrisch gemessen. Diese Bestimmung richtet sich nach den von Eggstein und Kreutz (1966) und Schmidt (1968) beschriebenen Angaben.

Reagenzien:

Verwendet wurde die Biochemica Test Combination für Neutralfette von Boehringer Mannheim.

Lösung 1: 0,1 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,6;
4 m M Mg SO_4

Lösung 2: 6 m M NADH; 33 m M ATP; 11 m M PEP

Lösung 3: 2 mg LDH/ml; 1 mg PK/ml

Lösung 4: 2 mg GK/ml

Äthanolische KOH, 0,5 N

Magnesiumsulfat-Lösung: ca. 0,15 M

Durchführung:

Von dem vorher beschriebenen Sperry-Extrakt pipettiert man 2 ml der unteren Phase in Schliffzentrifugengläser (Doppelbestimmungen). Als Leerwert, der im weiteren Verlauf wie die Proben behandelt wird, dienen 2 ml Chloroform.

Die Proben werden im Wasserbad eingedampft ohne dabei den

Sperry-Extrakt bzw. das Chloroform zum Kochen zu bringen. Mit Stickstoff läßt sich die Flüssigkeit in den Zentrifugengläsern völlig eintrocknen. Zur Verseifung gibt man 0,5 ml einer 0,5 N äthanolischen KOH-Lösung dazu und mischt gut. Die verschlossenen Gläser werden für 30 Minuten in ein 70°C warmes Wasserbad gestellt und danach mit Stöpsel wieder abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml einer 0,15 M $MgSO_4$ -Lösung und kräftigem Schütteln zentrifugiert man 40 Minuten bei 4000 U/min. Der Rückstand (obere Phase) wird für die weitere Bestimmung vorsichtig abgegossen.

Die photometrische Messung erfolgt am Eppendorf Photometer bei 366 nm mit Quarzküvetten am kleinen Spalt. Dazu werden folgende Lösungen nacheinander in die Halbmikroküvetten einpipettiert (siehe Reagenzien): 1 ml Lösung 1, 0,05 ml Lösung 2, 0,2 ml Überstand nach Zentrifugieren und 0,01 ml Lösung 3 (Starter). Nachdem die erste Küvette gemischt ist, wird genau nach jeweils 10 min die Extinktion E_1 abgelesen. Sind alle E_1 -Werte gemessen, dann gibt man zum Abschluß der Reaktion 0,01 ml der Lösung 4 dazu und mißt nach 10 min die Extinktion E_2 .

Berechnung:

Die Differenz $\Delta E = E_1 - E_2$ ist proportional der Konzentration der Neutralfette. Subtrahiert man den Leerwert (LW) von ΔE und multipliziert das Volumen der unteren Phase (V_{uPh}) des Sperry-Extraktes damit, dann erhält man unter Berücksichtigung der Verdünnungen folgende Formel:

$$\frac{(\Delta E - LW) \times V_{uPh}}{16} \times 2453 = \text{mg \% Neutralfett}$$

Beispiel:

Bei der Messung betrage der Leerwert $LW = 0,011$, $E_1 = 0,276$ und $E_2 = 0,234$ im Mittel. Dann ergibt sich mit $V_{uPh} = 13,0$ für die Triglyzeridkonzentration:

$$\frac{[(0,276 - 0,234) - 0,011] \times 13}{16} \times 2453 = 61,8 \text{ mg \%}$$

D. Ergebnisse:

1. Wirkungseintritt und Wirkungsdauer:

Nach einmaliger oraler Gabe von jeweils 0,5 g, 1,0 g bzw. 2,0 g Halofenat konnte bei den 8 Stunden nüchtern bleibenden Versuchspersonen kein oder nur ein geringer Abfall der Serumharnsäure und keine sichere Wirkung auf die normalen Neutralfettkonzentrationen beobachtet werden (Tab. 1,2,3). Bei weiteren Versuchen ließ sich jedoch eine deutlich senkende Wirkung auf die Serumharnsäure 10 Std. nach Einnahme nachweisen (Tab.4,5,6). Dieser 10 Stunden-Wert wurde 5 Std. nach Nahrungsaufnahme bestimmt. Die Serumharnsäurekonzentration fiel nach Einnahme von 1 g in zwei Versuchen um durchschnittlich 11,9 % (11,5 und 12,3 %), bei 1,5 g in 6 Versuchen um 9,7 % (5,6 - 12,9 %) und bei 2,0 g in 3 Versuchen um 10,1 % (8,3 - 12,9 %) nach 10 Std. ab. Nach 24 Std. lagen die Serumharnsäurekonzentrationen nach der 1,0 g Dosis wieder ganz nah am Ausgangswert, während die nach den 1,5 g und 2,0 g Dosierungen dem erniedrigten 10 Stundenwert entsprachen.

Die lange Wirkungsdauer von Halofenat auf den Harnsäurespiegel wurde besonders nach hoher, einmaliger Dosierung von 2 g deutlich und ließ einen kumulierenden Effekt vermuten, der nach Dauermedikation von täglich 1,5 g über 3 Tage bestätigt wurde (Abb. 1,2,3).

2. Einmalige Gabe von 1,0 g

Während bei einer 0,5 g Dosis nach 24 Std. keine erniedrigte Harnsäurekonzentration im Blut gefunden wurde

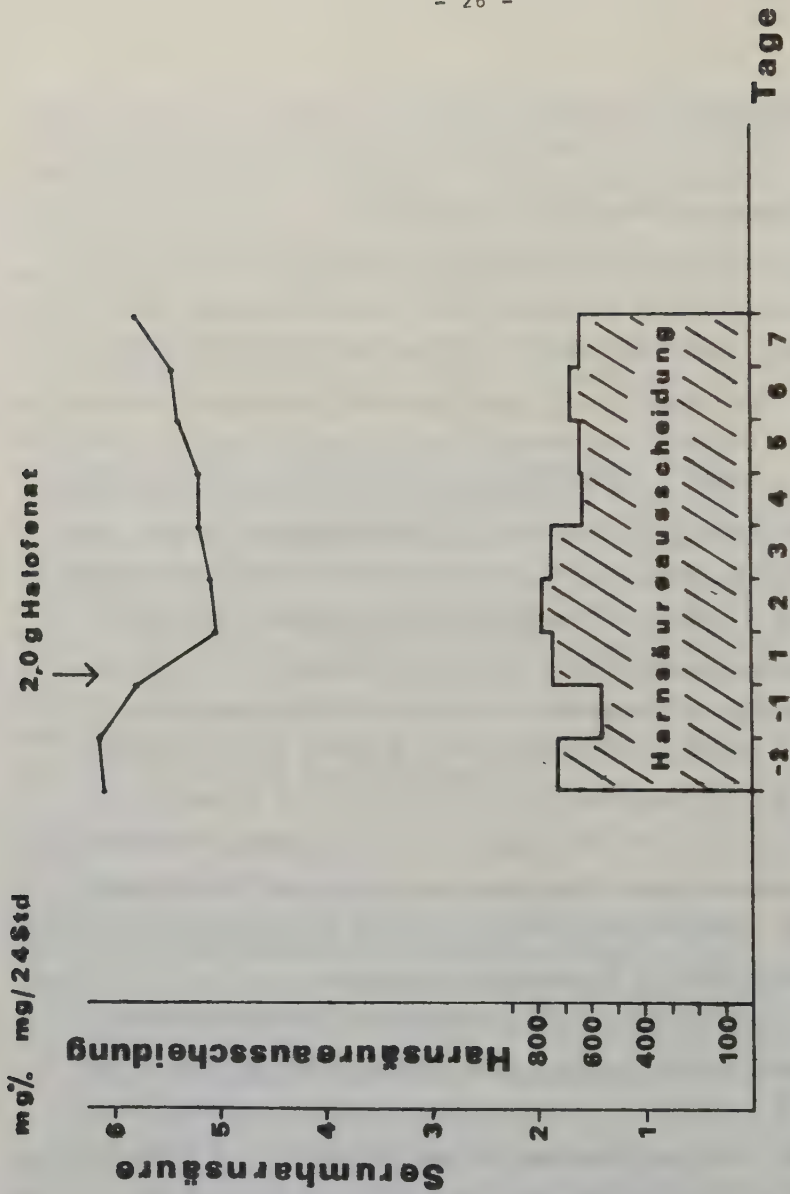


Abb. 1 : Verlauf von Serumharnsäure und Harnsäureausscheidung im 24 Std. Urin nach einmaliger Gabe von 2,0 g Halofenat (siehe Tab. 6; Versuchssper-
son B.G.)

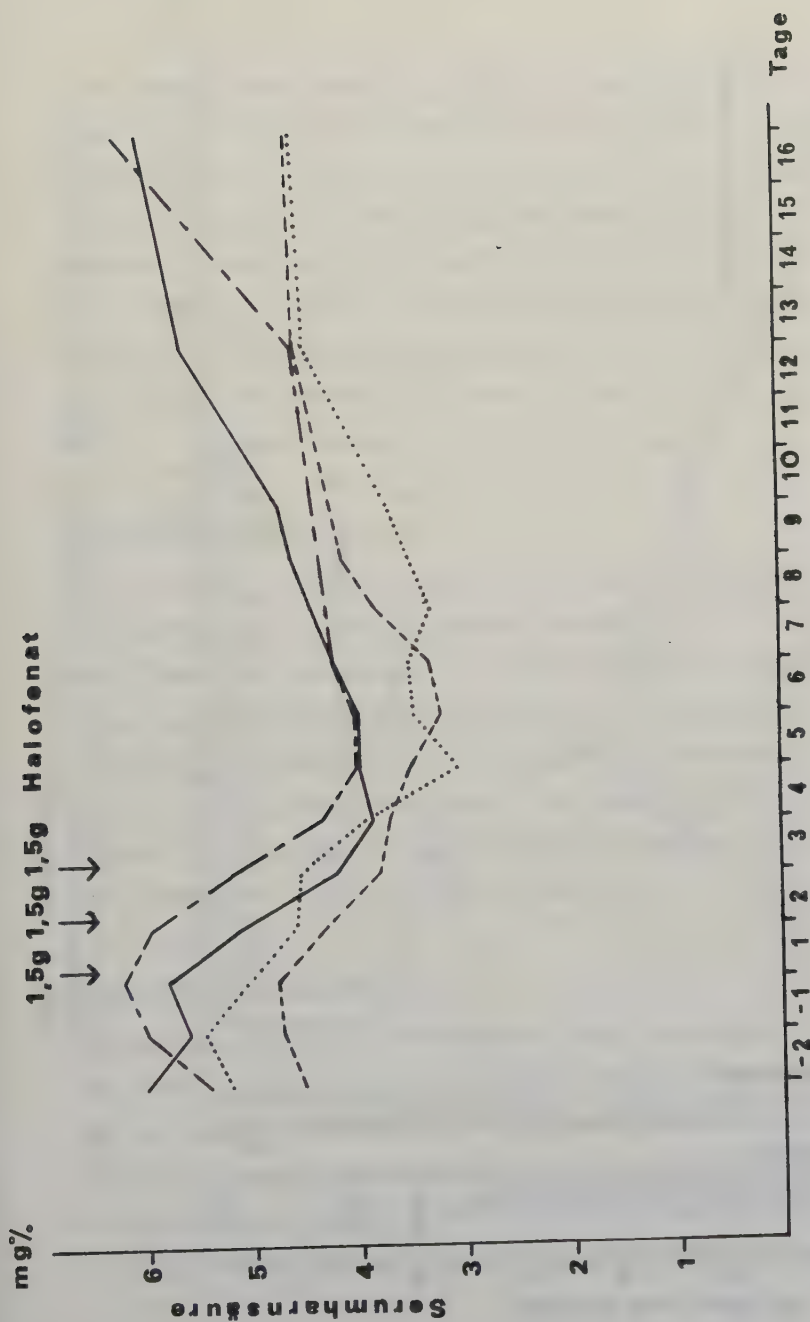


Abb. 2 : Verlauf der Serumharnsäure bei 4 Versuchspersonen nach dreimaliger Gabe von 1,5 g Halofenat (siehe Tab. 7)

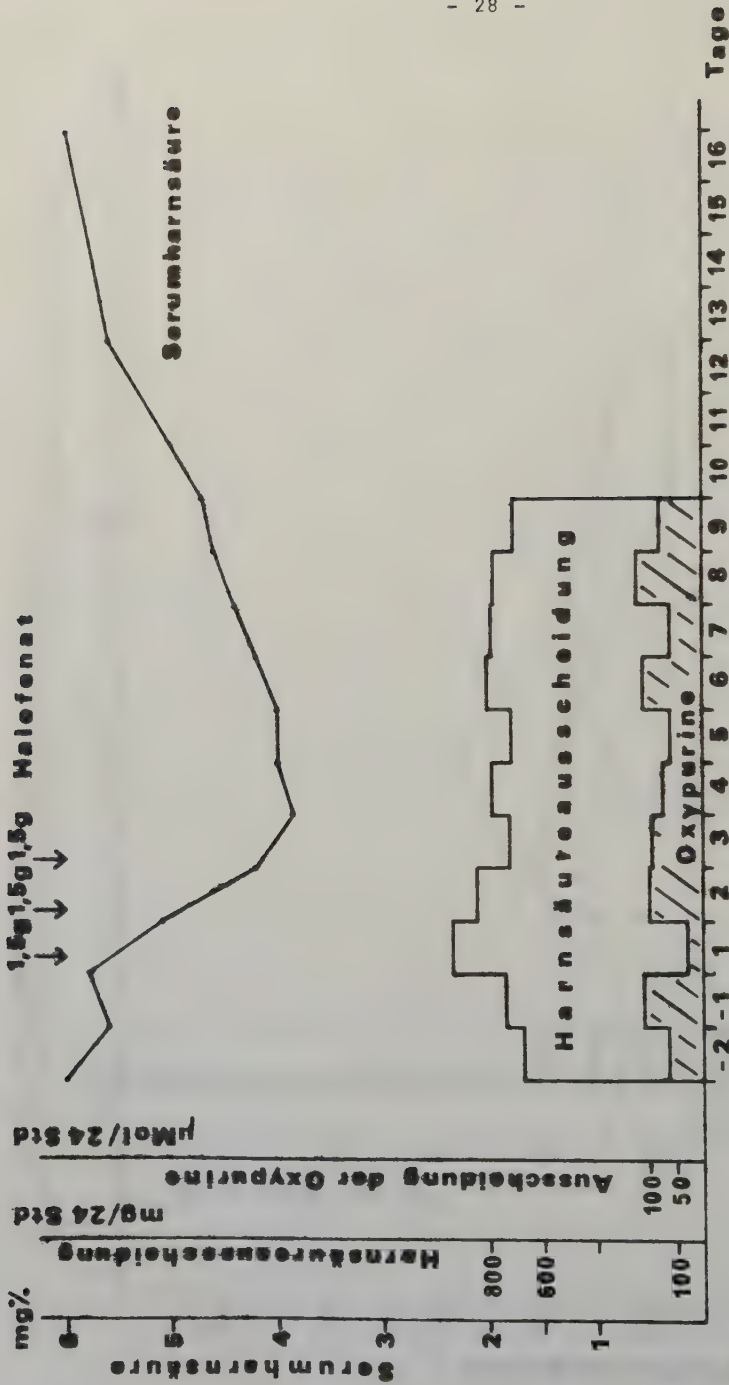


Abb. 3 : Verlauf von Serumharnsäure und der Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurinen im 24 Std. Urin nach dreimaliger Gabe von 1,5 g Halofenat (Tab. 7; Versuchsperson B.G.)

sank nach Einnahme von 1,0 g Halofenat der Serumharnsäurespiegel bei vier Versuchspersonen um 3,8 % (2,4 - 6,5 %) innerhalb von 24 Std. ab (Tab. 3,4). Über die Harnsäuremehrausscheidung im 24 Std. Sammelurin kann, wie die sehr geringe Abnahme der Serumharnsäure schon vermuten läßt, keine Aussage gemacht werden. Die aus Kontrollgründen mit bestimmten Triglyzeridkonzentrationen nahmen in 3 Fällen um durchschnittlich 17,3 % ab und in einem Fall um 11,5 % zu.

3. Einmalige Gabe von 1,5 g :

Die Gabe von 1,5 g führte nach 24 Std. bei 6 Versuchen zur Senkung des Harnsäurespiegels von 8,2 % (1,0 - 14 %) (Tab. 5). Diese durchschnittliche Abnahme bedeutet eine doppelt so starke Wirkung wie bei einer 1,0 g Dosis von Halofenat. Außerdem ließ sich ein niedriger Harnsäurespiegel noch mindestens bis zum 4. Tag nach Einnahme erkennen. Die Triglyzeridkonzentrationen sanken bei 2 Personen im Mittel um 19,4 % nach 24 Std. ab.

4. Einmalige Gabe von 2,0 g :

Die Serumharnsäurekonzentration fiel nach einmaliger Gabe von 2,0 g in 4 Versuchen um 12 % (6,3 - 18 %) nach 24 Std. ab (Abb. 1; Tab. 2,6). Die Wirkung dieser Dosis war damit, verglichen mit einer 1,0 g Dosis von Halofenat, um das Dreifache stärker. Bei einer Versuchsperson wurde nach deutlichem, initialem Abfall und dann folgender ste-

tiger Zunahme des Harnsäurespiegels am 7. Tag nach Einnahme der Ausgangswert wieder erreicht (Abb. 1). Die Harnsäureausscheidung im 24 Std. Urin und die Triglyzeridkonzentrationen wurden bei 3 Personen dieser Versuchsserie über längere Zeit kontrolliert. Am Tag nach Einnahme stieg die Harnsäureausscheidung von 2 Probanden auf 115,8 % bzw. 164,7 % des Ausgangswertes (Mittelwerte von 2 Tagen) an, eine Person zeigte einen um 3,6 % niedrigeren Wert. Da am 2. und 3. Tag die Ausscheidung zum Teil noch höher lag als am ersten, ergibt sich eine Harnsäuremehrausscheidung bei allen 3 Versuchspersonen von durchschnittlich 22,3 % (11,3 - 37,5 %) innerhalb von 3 Tagen.

Die normalen Neutralfettkonzentrationen dieser 4 Probanden fanden wir nach 24 Std. nur in einem Fall um 19,1 % gesenkt, während die anderen eine mittlere Zunahme von 37,1 % aufwiesen.

5. Einnahme von 1,5 g täglich über 3 Tage:

Nach Einnahme von je 1,5 g Halofenat an drei aufeinanderfolgenden Tagen zeigte sich bei den 4 Probanden eine wesentlich stärkere harnsäuresenkende Wirkung als nach einmaliger Gabe, die nur mit einem kumulierenden Effekt erklärt werden kann (Abb. 2; Tab. 7). So lag die Harnsäurekonzentration im Serum nach 24 Std. um durchschnittlich 8,6 % (1,5 g), nach 2 Tagen um 18,4 % (3,0 g) und nach 3 Tagen um 24,6 % (4,5 g) unter den entsprechenden Vor-

werten. Das absolute Minimum des Serumharnsäurespiegels wurde nach 4 Tagen mit einer mittleren Abnahme von 33,1 % gemessen. Von den Versuchspersonen erreichten zwei ihre Ausgangswerte 12 Tage nach Medikationsbeginn wieder. Eine Person, bei der schon die Anfangskonzentrationen größeren Schwankungen unterworfen waren, brauchte dafür 16 Tage. Eine andere wies auch nach dieser Zeit noch einen etwas niedrigeren Harnsäurespiegel auf.

Abb. 3 zeigt an einem typischen Beispiel das Verhalten der Serumharnsäure und der täglichen Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurinen über 16 Tage.

Nach 24 Std. stieg die Harnsäureausscheidung der 4 Probanden auf 120,1 % (113,7 - 136,2) des Ausgangswertes (Mittelwert von 2 Tagen) an. Am folgenden Tag lagen bei 2 Personen die Werte im Durchschnitt 14,7 % über und bei den anderen beiden 5,5 % unter den Vergleichswerten. Der dritte Tag unter Medikation brachte bei allen Probanden eine Ausscheidung von 125,9 % (105,2 - 145,8 %) des Ausgangswertes. Über 3 Tage betrachtet, lag die Harnsäuremehrausscheidung im Mittel bei 16,9 % (7,9 - 24,1 %).

Die Ausscheidung der Oxypurine (Hypoxanthin und Xanthin) nahm bei 3 Versuchspersonen nach 24 Std. um 29,4 % (8,5 - 64,1 %) in Bezug auf die Ausgangsperiode (Mittelwerte von 2 Tagen) ab, eine Person zeigte eine Zunahme von 86,5 %. Auch an den nächsten zwei Tagen ergab sich ein ähnlich uneinheitliches Bild, so daß sich in den 3 Tagen der Medikation die Ausscheidung der Oxypurine

bei 3 Probanden um 30,4 % (13,4 - 39,0 %) verringerte, bei einer Person um 10,8 % erhöhte.

Der Verlauf der Serumtriglyzeridkonzentrationen wurde nur bei einer Versuchsperson untersucht. Am ersten Tag nach Einnahme wurde eine geringe Senkung der Triglyzeridkonzentration von 15,7 % gemessen, die sich unter weiterer Applikation des Medikaments aber nicht verstärkte.

6. Dosis-Wirkungsbeziehung

Die Beziehungen zwischen der Dosis und der den Serumharnsäurespiegel senkenden Wirkung von Halofenat nach einmaliger Gabe zeigt Abb. 4. Da Halofenat eine lange Wirkungs-dauer (Halbwertszeit 48 Std.) besitzt, fielen die Harnsäurespiegel nach mehrmaliger Gabe von Halofenat bei insgesamt 3,0 g um 18,4 % und bei 4,5 g um 24,6 % ab (siehe S. 30).

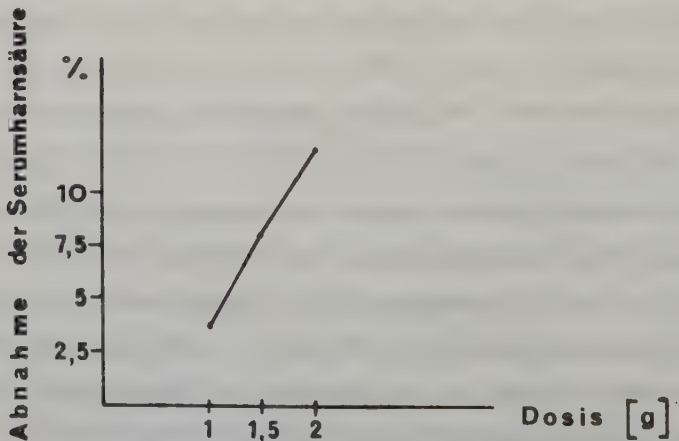


Abb. 4: Prozentuale Abnahme der Serumharnsäurekonzentration nach unterschiedlicher Dosierung von Halofenat. (24 Std. nach Einnahme)

7. Veränderte Bindung von Harnsäure an Serumproteine
nach Einnahme von 3,0 g :

Die Gesamtdosis von 3,0 g (jeweils 1,5 g an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) senkte in 4 Versuchen die Serumharnsäurekonzentration um durchschnittlich 23,8 % (17,5 - 30,8 %) nach 34 Std. Um diese Wirkung von Halofenat, die im Sinne einer Verdrängung der Harnsäure aus der Proteinbindung erklärt werden könnte, zu untersuchen, wurde die Bindung von Harnsäure an Serumproteine vor und 34 Std. nach Gabe von Halofenat gemessen.

Die Untersuchungen erfolgten nach der von Klinenberg beschriebenen Methode (siehe S. 16). Für Harnsäurekonzentrationen von durchschnittlich 16,1 mg% und für Proteinkonzentrationen von 6,9 g % (6,5 - 7,3 g %) im Serum in der Dialysetasche fanden wir, daß normalerweise 9,4 % (9,1 - 9,6 %) der Harnsäure an Eiweiß gebunden waren. Nach Einnahme von 3,0 g Halofenat erfolgte die Messung der Harnsäurebindung unter den gleichen Bedingungen (mittlere Harnsäurekonzentration 15,2 mg % im Serum; Eiweißkonzentration 6,9 g % (6,6 - 7,15 g %) im Serum. Es zeigte sich, daß nach Medikamentengabe nur noch 5,4 % (4,8 - 5,7 %) der Harnsäure an Proteine gebunden waren. Dies entspricht einer durchschnittlichen Abnahme von 42,7 % des entsprechenden Normalwertes (Tab. 8).

Tab. 1 Wirkung von 0,5 g Halofenat auf Serumharnsäure und Serumtriglyzeride bis zu 8 und nach 24 Std. nach einmaliger Einnahme

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	/	24 Std. nach oraler Gabe
<u>Serumharnsäure (mg %)</u>											
G.W., 37 J.	4,2	4,2	4,4	4,3	4,4	4,3	4,2	4,3	4,4		4,8
<u>Serumtriglyzeride (mg %)</u>											
G.W., 37 J.	47,9	39,2	33,4	38,6	34,7	38,6	39,9	38,0	36,3		65,3

Tab. 2 Wirkung von 2,0 g Halofenat auf Serumharnsäure und Serumtriglyzeride bis zu 8 und nach 24 Std. nach einmaliger Einnahme

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	/	24 Std. nach oraler Gabe
<u>Serumharnsäure (mg %)</u>											
B.G., 26 J.	5,95		5,9		5,8		5,95		5,8		5,3
<u>Serumtriglyzeride (mg %)</u>											
B.G., 26 J.	62,3		63,8		64,8		61,3		55,7		50,4

Tab. 3 Wirkung von 1,0 g Halofenat auf Serumharnsäure und Serumtriglyzeride
bis zu 8 und nach 24 Std. nach einmaliger Einnahme

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	/	24 Std. nach oraler Gabe
<u>Serumharnsäure (mg %)</u>											
1 G.W., 37 J.	4,1	4,1	3,9	3,9	4,0	3,9	4,0	3,9	4,1		4,0
2 B.G., 26 J.	6,2	6,15	6,2	6,05	5,95	6,1	6,05	5,85	5,8		5,8
<u>Serumtriglyzeride (mg %)</u>											
1 G.W., 37 J.	60,7	44,5	33,6	34,1	26,3	29,2	31,3	34,5	-		53,8
2 B.G., 26 J.	53,4	51,6	48,6	47,2	45,9	47,2	48,8	48,6	49,8		43,5

Tab. 4 Wirkung einer einmaligen Dosis von 1,0 g Halofenat auf Serumharnsäure, Serumtriglyzeride und Harnsäureausscheidung im 24 Std.Urin über 7 Tage nach Einnahme (entsprechender 10 Std.-Wert steht in Klammern)

	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8
	(Tage vor und nach Gabe)									
<u>Serumharnsäure (mg %)</u>										
1 G.W., 37 J.	4,85(4,6)	4,7(4,9)	4,8(4,25)	4,7(4,8)	4,6(4,4)	4,4(4,4)	4,3(4,45)	4,5(4,65)	5,05(5,2)	5,1(4,95)
2 B.G., 26 J.	- (6,2)	6,0(6,3)	6,1(5,35)	5,85(5,8)	5,8(5,3)	5,85(5,75)	6,05(5,9)	5,75(5,45)	5,3(4,85)	5,6(5,6)
<u>Harnsäureausscheidung</u>										
im 24 Std.Urin (mg/24 Std.)										
1 G.W., 37 J.	578	640	640	640	656	539	539	669	651	
2 B.G., 26 J.	631	630	612	662	526	529	673	772	578	
<u>Serumtriglyzeride (mg %)</u>										
1 G.W., 37 J.	92,7	54,2	58,7	66,3	53,0	55,2	41,2	66,8	76,3	80,7
2 B.G., 26 J.	69,3	64,8	53,6	41,9	40,9	39,2	45,1	47,2	41,2	46,8

Tab. 5 Wirkung einer einmaligen Dosis von 1,5 g Halofenat auf Serumharnsäure und Serumtriglyzeride (10 Std.-Wert nach Einnahme steht bei 1 in Klammern)

	-2	-1	1	2	3	4	5	Tage vor und nach Gabe
<u>Serumharnsäure (mg %)</u>								
1 G.W., 37 J.	-	-	5,0(4,7)	4,3	3,9	4,0	3,95	
2 B.G., 26 J.	-	-	5,4(5,1)	5,35	4,5	4,75	-	
3 B.G., 26 J.	6,0	5,6	5,8(5,05)	5,1	-	-	-	
4 G.W., 37 J.	4,5	4,7	4,75(4,15)	4,3	-	-	-	
5 W.G., 35 J.	5,4	6,0	6,2(5,4)	5,95	-	-	-	
6 O.A., 34 J.	5,2	5,45	5,05(4,65)	4,6	-	-	-	
<u>Serumtriglyzeride (mg %)</u>								
1 G.W., 37 J.	-	-	110,3	86,0	81,3	58,8	106,6	
2 B.G., 26 J.	-	-	62,3	51,8	46,2	36,9	-	
3 B.G., 26 J.	72,2	56,8	49,2	41,5	-	-	-	

Tab. 6 Wirkung einer einmaligen Dosis von 2,0 g Halofenat auf Serumharnsäure, Harnsäureausscheidung im 24 Std. Urin und Serumtriglyzeride (10 Std.-Wert nach Gabe steht bei 1 in Klammern)

-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8
(Tage vor und nach Gabe)									

Serumharnsäure (mg %)

1 B.G., 26 J.	6,1	6,15	5,8(5,05)	5,05	5,1	5,2	5,2	5,4	5,45	5,8
2 G.W., 37 J.	4,75	5,1	5,0(4,55)	4,1	4,6	4,4	4,5	4,2	4,9	4,45
3 G.W., 37 J.	4,8	5,0	4,8(4,4)	4,5	4,4	4,7	4,7	-	-	-

Harnsäureausscheidung

im 24 Std.Urin (mg/24 Std.)

1 B.G., 26 J.	728	554	742	781	746	628	636	674	638
2 G.W., 37 J.	611	700	632	478	1079	832	803	731	574
3 G.W., 37 J.	534	435	798	477	723	649	-	-	-

1
3
8
1

Serumtriglyzeride (mg %)

1 B.G., 26 J.	49,8	59,2	52,2	57,2	42,1	46,2	41,2	42,2	52,2	36,2
2 G.W., 37 J.	78,7	51,2	58,8	112,4	114,5	42,2	36,9	71,3	50,8	49,8
3 G.W., 37 J.	31,9	60,8	93,7	103,6	84,7	36,2	56,8	-	-	-

Tab. 7 Serumharnsäure, Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurin und Serumtriglyzeride vor und nach täglicher Gabe von jeweils 1,5 g Halofenat über 3 Tage

	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	17
	(Tage vor und nach Gabe)													
<u>Serumharnsäure (mg %)</u>														
1 O.A., 34 J.	5,2	5,45	5,05	4,6	4,55	3,9	3,05	3,45	3,5	3,3	4,15	3,7	4,45	4,55
2 B.G., 26 J.	6,0	5,6	5,8	5,1	4,2	3,85	4,0	4,0	4,2	4,4	4,6	4,7	5,6	6,0
3 G.W., 37 J.	4,5	4,7	4,75	4,3	3,8	3,7	3,5	3,2	3,3	3,8	4,1	4,2	4,55	4,6
4 W.G., 35 J.	5,4	6,0	6,2	5,95	5,2	4,35	4,0	4,0	4,2	-	-	-	4,55	6,2
<u>Harnsäureausscheidung</u>														
im 24 Std.Urin (mg/24 Std.)														
1 O.A., 34 J.	518	624	656	553	780	392	597	660	462	492	474			
2 B.G., 26 J.	676	744	968	827	748	797	729	798	781	763	689			
3 G.W., 37 J.	619	689	756	603	758	886	705	653	544	680	634			
4 W.G., 35 J.	265	350	350	347	448	516	253	350	-	-	-			
<u>Oxypurine im 24 Std.Urin (μMol/24 Std.)</u>														
1 O.A., 34 J.	122	156	127	75	54	27	84	125	89	175	85			
2 B.G., 26 J.	65	110	32	102	94	72	60	113	61	127	80			
3 G.W., 37 J.	54	70	116	28	62	59	80	44	39	74	28			
4 W.G., 35 J.	18	33	21	13	12	18	15	24	-	-	-			
<u>Serumtriglyzeride (mg %)</u>														
2 B.G., 26 J.	72,2	56,8	49,2	41,5	50,6	41,9	43,9	52,8	60,8	55,8	58,2	61,3	47,8	40,5

Tab. 8 Die Bindung von Harnsäure an Serumproteine vor und nach Gabe von 3,0 g Halofenat

	I	II	III	IV	V	VI
	Serumharnsäure vor Dialyse (mg %)	Gesamteiweiß im Serum (g %)	Harnsäurekonz. im Puffer (mg %)	Harnsäurekonz. im Serum nach Dialyse (mg %)	Harnsäurebindung im entspr. Serum (in %)	Abnahme der Harnsäure- bindung (in % des ent- sprech. Normalwertes)
<u>Vor Einnahme</u> von Halofenat:						
1. B.G.	5,2	7,3	15,0	16,6	9,6	
2. B.G.	5,35	7,1	14,2	15,7	9,5	
3. G.W.	4,0	6,7	15,0	16,5	9,1	
4. G.W.	4,3	6,5	14,2	15,7	9,5	
<u>Nach Einnahme</u> von Halofenat:						
1. B.G.	4,1	7,15	14,8	15,7	5,7	40,6
2. B.G.	3,7	7,05	14,0	14,8	5,4	43,2
3. G.W.	3,3	6,7	14,8	15,7	5,7	37,4
4. G.W.	3,2	6,6	14,0	14,7	4,8	49,5

E. Diskussion:

Bisher wurde eine Senkung des Serumharnsäurespiegels nach Einnahme von Halofenat fast ausschließlich bei Patienten mit Hypertriglyzeridämien bzw. Hyperlipoproteinämien gefunden. Wir konnten in unseren Versuchen auch bei Gesunden eine Abnahme der Serumharnsäurekonzentration feststellen, die sich mit den Ergebnissen von Patienten mit Fettstoffwechselstörungen vergleichen läßt. Unsere gesunden Probanden zeigten nicht nur über wenige Tage, sondern auch über einen Zeitraum von Wochen einen konstanten Harnsäurespiegel. Der nüchtern gemessene Wert der Serumharnsäurekonzentration unterschied sich meistens unwesentlich vom entsprechenden 10 Std.-Wert, der 10 Std. nach Halofenatgabe und 5 Std. nach Nahrungskarenz erstellt wurde. Damit ließ sich der 10 Std.-Wert als Parameter für den Wirkungseintritt heranziehen.

Halofenat wies bei unseren Versuchspersonen nach 8 Std. noch keine sichere, nach 10 Std. eine deutliche Wirkung auf die Serumharnsäure auf. Dies steht gut mit Ergebnissen von Ravenscroft und Mitarbeitern (1973) im Einklang, bei denen sich erst 6-8 Std. nach Gabe von 1,0 g Halofenat die größte harnsäureausscheidende Wirkung im Urin fand.

Nach Einnahme einer Einzeldosis von 1,0 g nahm der Harnsäurespiegel unserer Probanden um durchschnittlich 3,8 % nach 24 Std. ab, während Ravenscroft et al. (1973) bei

6 hyperlipidämischen und hyperurikämischen Patienten mit 4,8 % Abnahme noch niedrigere Spiegel erreichte. Vergleicht man die harnsäuresenkenden Eigenschaften einer einmaligen 1,0, 1,5 und 2,0 g Gabe untereinander, so wirkte die 1,5 Dosis ungefähr doppelt so stark und die 2,0 g Dosis etwa dreimal so stark wie eine 1,0 g Dosis. Diese im Vergleich zu höheren Dosierungen zu geringe Wirkung einer 1,0 g Applikation könnte dadurch erklärt werden, daß die entsprechenden Meßergebnisse, die im Bereich normaler Tagesschwankungen liegen, schwieriger zu bewerten waren. Da durch eine einmalige 0,5 g Gabe die Serumharnsäurekonzentration einer Versuchsperson von 4,2 auf 4,8 mg % nach 24 Std. erhöht wurde, wäre auch an eine paradoxe harnsäureretinierende Wirkung von Halofenat zu denken, wie sie sich bei vielen Urikosurika in niedriger Dosierung beobachten läßt.

Eine ausgeprägte Senkung der Serumharnsäure erzielten wir innerhalb von 3 Tagen, an denen wir jeweils 1,5 g Halofenat gaben. Die dabei gefundene durchschnittliche Abnahme des Harnsäurespiegels um 24,6 % liegt im Rahmen der bisher von anderen Forschern bei Patienten mit Störungen des Fett- bzw. Harnsäurestoffwechsels ermittelten Werte. So nahm die Serumharnsäurekonzentration bei Untersuchungen von Ravenscroft et al. (1973) nach Einnahme von jeweils 1,0 g an 3 Tagen signifikant um 18 % ab. Jain und Mitarbeiter (1970) fanden nach einer Dosierung von täglich 20 mg/kg an 3 Tagen eine mittlere Senkung

der Serumharnsäure von 13 %, die aber nicht signifikant war.

Unter Langzeitbehandlung von Patienten mit Fettstoffwechselstörungen mit Halofenat wurde über eine noch stärkere Wirkung berichtet. Die Serumharnsäurekonzentrationen fielen nach täglicher Halofenatgabe bei Untersuchungen von Morgan et al. (1971) um 30 % nach 6 Wochen (Dosis 1,0 g), bei Jain et al. (1970) um 48,4 % nach 12 Wochen (Dosis 20 mg/kg) und bei Aronow et al. (1973) um 35 % nach 48 Wochen (Dosis 0,5 g) ab.

Mit der Senkung der Serumharnsäure nach Einnahme von Halofenat stieg bei unseren Versuchspersonen auch die renale Harnsäureausscheidung an. Bei einem urikosurischen Wirkungsmechanismus von Halofenat sollte die Harnsäuremehrausscheidung im Urin zu der Abnahme des "Harnsäure-Mindest-Pools" in Beziehung stehen, der nach Zöllner (1960) folgendermaßen berechnet wird:

Mindestpool (mg) = $0,254 \times \text{Körpergewicht (kg)} \times \text{Serumharnsäure (mg/l)}$.

Die vier von uns untersuchten Personen, die an 3 Tagen jeweils 1,5 g Halofenat eingenommen hatten, zeigten über diesen Zeitraum eine Harnsäuremehrausscheidung von mindestens 156 bis höchstens 412 mg/72 Std. Für die entsprechende Abnahme des Harnsäuremindestpools lassen sich Werte, die zwischen 188 und 337 mg/72 Std. liegen, berechnen. Da sich im Durchschnitt für gemessene und berechnete Harnsäuremehrausscheidung fast identische Werte ergeben,

kann der Abfall der Serumharnsäure als Folge einer vermehrten Ausscheidung von Harnsäure im Urin erklärt werden. Diese urikosurische Wirkung von Halofenat ist auch nach Ergebnissen anderer Forscher nicht stark ausgeprägt. Jain et al. (1970) sprechen von einem milden Urikosurikum, das die renale Harnsäureausscheidung zunehmend erhöht. Morgan et al. (1971) untersuchten über 6 Wochen in einem Doppel-Blind-Versuch 9 Patienten mit Hypertriglyceridämien und konnten bei 5 Patienten eine urikosurische Wirkung von Halofenat feststellen, die unabhängig von der glomerulären Filtrationsrate war. Bei Untersuchungen von 5 gesunden Probanden und 4 Gichtpatienten fanden Schlostein et al. (1973) zwar keinen signifikanten Anstieg der Harnsäureausscheidung nach Halofenatgabe, aber eine signifikante Zunahme der Harnsäureclearance. Von Ravencroft et al. (1973) wird jedoch unter purinfreier Diät schon nach Gabe einer Einzeldosis von 1,0 g Halofenat bei Patienten mit einer Hyperurikämie über eine urikosurische Wirkung berichtet, die 48 Std. anhielt. Nach dreitägiger Gabe von jeweils 1,0 g stieg die Harnsäureausscheidung laufend weiter auf noch höhere Werte an. Auch Untersuchungen, die von Fanelli et al. (1972) an Schimpansen durchgeführt wurden, sprechen für eine urikosurische Wirkungsweise von Halofenat. [(4-chlorophenyl) (3-trifluoromethylphenoxy)] Essigsäure (HFA), die freie Säure von Halofenat, wird dabei von den Tubuli der Schimpansenniere aktiv sezerniert und passiv reab-

sorbiert. Da sowohl Probenecid als auch Paraaminohippursäure (PAH) die Ausscheidung von Halofenat durch die Niere verhindern konnten, erwarteten Fanelli et al. einen dem Probenecid ähnlichen kompetitiven Wirkungsmechanismus.

Eine weitere Erklärung für die urikosurische Wirkung von Halofenat beruht darauf, daß die im Organismus gebildete freie Säure, HFA, Harnsäure aus der Bindung an Plasmaproteine verdrängen kann. Die dadurch filtrierbar gewordene Harnsäure wird innerhalb der Nierentubuli wahrscheinlich vermindert reabsorbiert und deshalb renal ausgeschieden (Whitehouse et al. 1971). Auch für Probenecid ließ sich eine Abnahme der an Plasmaproteine gebundenen Harnsäure nach Einnahme des Medikaments zeigen (Bluestone et al. 1969 und 1970, Whitehouse et al. 1971). Zum überwiegenden Teil ist die Harnsäure an die Albuminfraktion im Blut gebunden (Alvsaker 1965 a, 1966). Der insgesamt an Plasmaproteine gebundene Harnsäureanteil konnte noch nicht genau gemessen werden; die Werte dafür liegen je nach Untersuchungsmethode bei 7 % (Farrell et al. 1971), 15 % (Whitehouse et al. 1973), 20 % (Klinenberg et al. 1970) und 23,5 % (Campion et al. 1974). In unseren Versuchen, bei denen wir uns nach der Methode von Klinenberg et al. (1970) richteten, waren beim Gesunden 9,4 % der Harnsäurekonzentration an Serumproteine gebunden.

Nach Gabe von 3,0 g (jeweils 1,5 g an 2 Tagen) Halofenat fanden wir nach 34 Std. eine Abnahme der normalen Harnsäurebindung an Serumproteine von 43 %. Die entsprechende Senkung des Harnsäurespiegels betrug 24 %. Bei einer Untersuchung von Schlosstein et al. (1973) nahm die Harnsäurebindung bei 9 Probanden (5 gesunde Probanden, 4 Gichtpatienten) nach 14 Tagen bei einer täglichen Dosis von 1,0 g Halofenat um 39 %, die Serumharnsäurekonzentration um 45 % ab. Es muß dabei beachtet werden, daß die Harnsäurebindung an Proteine nicht unter physiologischen Bedingungen bei 4° C bestimmt wurde und diese Messungen nur einen hypothetischen Wirkungsmechanismus unterstützen. Bei Temperaturen von 37 ° C dürfte die Harnsäure in geringerem Maße, vielleicht sogar physiologisch unbedeutend gebunden sein (Farrell et al. 1971).

Die geringe urikosurische Wirkung von Halofenat könnte theoretisch auch durch eine entsprechende Zunahme der enteralen Harnsäureausscheidung erklärt werden, wie es neuerdings einem anderen Urikosurikum, Benzbromaronum, zugeschrieben wird (Müller et al. 1975). Ein solcher Wirkungsmechanismus ist jedoch für Halofenat noch nicht diskutiert worden.

Da sich die Ausscheidung von Oxypurinen im 24 Std.-Urin bei 3 von unseren 4 Probanden um durchschnittlich 30 % verminderte, ist ein hemmender Einfluß von Halofenat auf das Ferment Xanthinoxidase und eine damit verbundene Mehrausscheidung von Oxypurinen unwahrscheinlich. Die ver-

minderte Bildung von Oxypurinen, die Jain et al. (1970) auch feststellten, kann von uns nur durch eine große Schwankungsbreite der normalen Ausscheidungswerte erklärt werden.

Eine Beeinflussung normaler Triglyzeridwerte durch Halofenat konnte unter unseren Versuchsbedingungen, bei denen die Triglyzeridkonzentrationen häufig im unteren Normalbereich lagen und wenig konstant waren, weder erwartet noch gezeigt werden.

Bei der Therapie der Hypertriglyzeridämie bzw. Hyperlipoproteinämie ließ sich nach Halofenatgabe immer eine signifikant senkende Wirkung auf die Triglyzeridkonzentrationen nachweisen. Aronow et al. (1973) fanden bei 48 Patienten mit Hyperlipoproteinämien unterschiedlicher Typen eine Abnahme der pathologischen Triglyzeridwerte in 49 % nach 48 Wochen. Die Cholesterinkonzentrationen wurden dabei nicht signifikant gesenkt. Von 34 Patienten mit einer Hyperlipoproteinämie vom Typ IV nach Fredrickson wiesen 83 % nach 3 Monaten einen verminderten Triglyzeridspiegel auf (Berkowitz et al. 1971). Morgan et al. (1971) konnten bei 10 Patienten mit Hypertriglyzeridämien nach 6 Wochen eine durchschnittliche Abnahme der Triglyzeridspiegel um 50 %, aber keine signifikante Abnahme des Cholesterins finden.

Diese Untersuchungen zeigen eine mit der Wirkung von Clofibrat vergleichbare Reduzierung der erhöhten Triglyzeridkonzentrationen nach Halofenatgabe. Halofenat

scheint aber gar nicht oder zumindest nicht in dem Maße wie Clofibrat zur Senkung des Cholesterinspiegels geeignet zu sein.

F. Zusammenfassung:

Die Wirkung von Halofenat auf Serumharnsäure und renale Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurinen wurde bei Gesunden, zum Teil in höherer Dosierung als üblich, untersucht. Dabei ließ sich ein urikosurischer Wirkungsmechanismus erkennen. Im Einzelnen fanden wir folgende Ergebnisse (Durchschnittswerte) :

1. Die Wirkung von Halofenat auf den Serumharnsäurespiegel tritt langsam ein. Nach 8 Std. lag keine sichere, nach 10 Std. eine deutliche Abnahme des Harnsäurespiegels vor.
2. Die einmalige orale Gabe von jeweils 1,0, 1,5 und 2,0 g führte innerhalb von 24 Std. zu einer entsprechenden Senkung des Serumharnsäurespiegels um 3,8, 8,2 und 12 %. Die Harnsäuremehrausscheidung im 24 Std. Urin betrug nach Einnahme einer 2,0 g Dosis 22,3 % (Mittelwerte von 3 Tagen nach Gabe).
3. Die an drei aufeinanderfolgenden Tagen verabreichte Dosis von jeweils 1,5 g senkte die Serumharnsäurekonzentration um maximal 33,1 % am 4. Tag nach Einnahmebeginn. Am dritten Tag unter Medikation lag die Harnsäuremehrausscheidung im 24 Std. Urin mit 25,9 % am deutlichsten über den Vergleichswerten. Außerdem zeigte sich bei 3 von 4 Versuchspersonen eine Abnahme der Ausscheidung von Oxypurinen im Urin.

4. Die Serumharnsäurekonzentration fiel in Abhängigkeit zur Halofenatdosis ab. Nach Gabe von 1,5 g an drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde ungefähr am 12. Tag nach Medikationsbeginn erst wieder der Ausgangswert der Serumharnsäurespiegel erreicht!
5. Nach Einnahme von insgesamt 3,0 g Halofenat verringerte sich die Harnsäurebindung an Serumproteine innerhalb von 34 Std. um 42,7 %. Die Serumharnsäurekonzentration nahm in diesem Zeitraum um 23,8 % ab. Damit könnte die urikosurische Wirkung von Halofenat zumindest zum Teil als Folge einer Verdrängung von Harnsäure aus ihrer physiologischen Proteinbindung im Blut erklärt werden.

G. Literaturverzeichnis

ALVSAKER, J.O.;

Uric acid in human plasma.III. Investigations on the interaction between the urate ion and human albumin.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 17 (1965 a) 467

ALVSAKER, J.O.;

Uric acid in human plasma.V. Isolation and identification of plasma proteins interacting with urate.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 18 (1966) 227

ARONOW, W.S.; P.R. HARDING; M. KHURSHEED; J.S.

VANGROW; N.P. PAPAGEORGE`S; J. MAYS

Effect of Halofenate on serum lipids

Clin. Pharmacol. Ther. 14 (1973) 358

ARONOW, W.S.; P.R. HARDING; M. KHURSHEED; J.S.

VANGROW; N.P. PAPAGEORGE`S

Effect of halofenate on serum uric acid.

Clin. Pharmacol. Ther. 14 (1973) 371

BARLOW, K.A.

Hyperlipämia in primary gout

Metabolism 17 (1968) 3:289

BENEDEK, T.G.

Correlations of serum uric acid and lipid concentrations in normal, gouty and atherosclerotic men.

Ann. intern. Med. 66 (1967) 851

BERKOWITZ, D.

Blood lipid and uric acid interrelationships.

JAMA 190 (1964) 856

BERKOWITZ, D.

The effects of chlorophenoxyisobutyrate with and without androsterone on the serum lipids, fat tolerance and uric acid.
Metabolism 14 (1965) 966

BERKOWITZ, D.

Clinical experiences with MK-185, a new hypo-lipidemic agent.
Circulation 44 (1971) Suppl. II-12

BERKOWITZ, D.

Long-term treatment of hyperlipidemic patients with clofibrate.
J. Amer. med. Ass. 218 (1971) 1002

BLUESTONE, R.; I. KIPPEN; J.R. KLINENBERG

Effect of drugs on urate binding to plasma proteins.
Br. Med. J. 4 (1969) 590

BLUESTONE, R.; I. KIPPEN; J.R. KLINENBERG;

M.W. WHITEHOUSE

Effect of some uricosuric and anti-inflammatory drugs on the binding of uric acid to human serum albumin in vitro.
J. Lab. Clin. Med. 76 (1970) 85

CAMPION, D.S.; R. BLUESTONE; J.R. KLINENBERG

Displacement by uricosuric agents of sodium urate bound to human serum albumin.
Biochem. Pharmacol. 23 (1974) 1653

DEWAR, H.A.; M.F. OLIVER

Secondary prevention trials using clofibrate: a joint commentary on the Newcastle and Scottish trials.
Brit. Med. J. 4 (1974) 784

EGGSTEN, M.; F.H. KREUTZ

Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe. I Mitteilung: Prinzip, Durchführung und Besprechung der Methode.
Klin. Wschr. 44 (1966) 262

EGGSTEN, M.

Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe. II Mitteilung: Zuverlässigkeit der Methode, andere Neutralfettbestimmungen, Normalwerte für Triglyceride und Glycerin im menschlichen Blut.
Klin. Wschr. 44 (1966) 267

EMMERSON, B.T.; B.R. KNOWLES

Triglyceride concentrations in primary gout and gout of chronic lead nephropathy.
Metabolism 20 (1971) 8: 721

FANELLI, G.M.jr.; D.L. BOHN; S.S. REILLY; J.E. BAER

Renal excretion and uricosuric properties of halofenate, a hypolipidemic-uricosuric agent in the chimpanzee.
J. Pharmac. exp. Ther. 180 (1972) 377

FARRELL, P.C.; R.P. POPOVICH; A.L. BABB

Binding levels of urate ions in human serum albumin and plasma.
Biochem. Biophys. Acta 243 (1971) 49

FELDMAN, E.B.; S.L. WALLACE

Hypertriglyceridemia in gout.
Circulation 29 (1964) 508

GIBSON, T.; R. GRAHAME

Gout and hyperlipidaemia.
Ann. rheum. Dis. 33 (1974) 298

HUCKER, H.B.; L.T. GRADY; B.M. MICHNIEWICZ;
S.C. STAUFFER; S.E. WHITE; G.E. MAHA; F.G.
McMAHON

Metabolism of 2-acetamidoethyl (p-chlorophenyl)
(m-trifluoromethylphenoxy) acetate in the rat,
dog, rhesus monkey and man.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 179 (1971) 359

JAIN, A.; J.R. RYAN; D. HAGNE; F.G. McMAHON
The effect of MK-185 on some aspects of uric
acid metabolism.
Clin. Pharmacol. Ther. 11 (1970) 551

KLINENBERG, J.R.; S. GOLDFINGER; K.H. BRADLEY;
E. SEEGMILLER
An enzymatic spectrophotometric method for the
determination of xanthine and hypoxanthine.
Clinical Chemistry 13 (1967) 834

KLINENBERG, J.R.; I. KIPPEN
The binding of urate to plasma proteins deter-
mined by means of equilibrium dialysis.
J. Lab. clin. Med. 75 (1970) 503

KRASNO, L.R.; G.J. KIDERA
Clofibrate in coronary heart disease. Effect
on morbidity and mortality.
J. Amer. med. Ass. 219 (1972) 845

LOWRY, O.H.; N.J. ROSEBROUGH; A.L. FARR; R.J.
RANDALL
Protein measurement with the folin phenol
reagent.
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265

MORGAN, J.P.; J.R. BIANCHINE; T.H. HSU; L.
LASAGNA
The uricosuric and thyroxine displacing effect
of MK-185, a new hypolipemic agent.
Clin. Res. 19 (1971 a) 27

MORGAN, J.P.; J.R. BIANCHINE; T.H. HSU;
S. MARGOLIS

Hypolipidemic, uricosuric, and thyroxine-
displacing effects of MK-185 (halofenate)
Clin. Pharmacol. Ther. 12 (1971 b) 517

MÜLLER, M.M.; E. KAISER

Die Regulation des Purinstoffwechsels und
seine medikamentöse Beeinflussung.
Dtsch. med. Wschr. 100 (1975) 198

NEWLAND, H.

Antagonism of the antithrombotic effect of
Warfarin by uric acid.
Americ. J. med. Sci. 256 (1968) 44

PRAETORIUS, E.; H. POULSEN

Enzymatic determination auf uric acid with
detailed directions.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5 (1953) 273

RAVENS-CROFT, P.J.; J.M. SANDS; B.T. EMMERSON;

Studies of the uricosuric action of the hypo-
lipidemic drug halofenate.
Clin. Pharmacol. Ther. 14 (1973) 547

SCHLOSSTEIN, L.H.; I. KIPPEN; M.W. WHITEHOUSE;

R. BLUESTONE; H.E. PAULUS; J.R. KLINENBERG

Studies with some novel uricosuric agents and
their metabolites: correlation between clinical
activity and drug-induced displacement of urate
from its albumin-binding sites.
J. Lab. Clin. Med. 82 (1973) 412

SCHMIDT, F.H.; K. v. DAHL

Zur Methode der enzymatischen Neutralfett-Be-
stimmung im biologischen Material.
Zschr. klin. Chem. klin. Biochem. 6 (1968) 156

SPERRY, W.M.

Lipid analysis. In: Methods of biochemical analysis 2, 83.
Interscience Publ., New York - London (1955)

TREVAKS, G.; R.R.H. LOVELL

Effect of atromid and its components on uric acid excretion and on gout.
Ann. rheum. Dis. 24 (1965) 572

WHITEHOUSE, M.W.; I. KIPPEN; J.R. KLINENBERG

Biochemical properties of anti-inflammatory drugs. XII. Inhibition of urate binding to human albumin by salicylate and phenylbutazone analogues and some novel anti-inflammatory drugs.
Biochem. Pharmacol. 20 (1971) 3306

WHITEHOUSE, M.W.; I. KIPPEN; J.R. KLINENBERG;
L. SCHLOSSTEIN; D.S. CAMPION; R. BLUESTONE

Increasing excretion of urate with displacing agents in man.
Ann. NY Acad. Sci. 226 (1973) 309

ZÖLLNER, N.

Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung. Normalwerte in der deutschen Bevölkerung.
Z. Klin. Chem. 1 (1963) 178

Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Wolfram danke ich für die Überlassung des Themas und die Anleitung bei den experimentellen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. med. N. Zöllner möchte ich für die Arbeitsmöglichkeit an seiner Klinik sowie die Übernahme des Korreferats danken.

Freundliche Unterstützung erhielt ich durch Herrn Priv. Doz. Dr. med. W. Gröbner und durch Dr. med. O. Adam.

Für die Niederschrift der Arbeit danke ich Frau Oberdörster.

Lebenslauf:

Am 18.2.1949 wurde ich, Berndt Grafe, als Sohn des Dr. med. Günter Grafe und seiner Ehefrau, Dr. med. Ursula Grafe, in Berlin geboren.

Die Grundschule besuchte ich in Berlin. 1961 trat ich in das Erasmus Grasser Gymnasium in München ein und legte dort 1968 die Reifeprüfung ab.

An der Ludwig-Maximilians Universität in München studierte ich vom Wintersemester 1968/69 an vier Semester Physik und begann im Wintersemester 1970/71 mit dem Studium der Humanmedizin, das ich im Sommer 1976 mit dem Staatsexamen abschloß.

Als Medizinalassistent arbeitete ich bisher an der Chirurgischen Klinik Dr. Rinecker und bin zur Zeit auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Wolfratshausen tätig.

